

Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. F. Leuthardt

Über die Argininsynthese in Niere und Leber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

Vorgelegt von
MATHIAS STAEHELIN
von Basel

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. F. Leuthardt

Zürich 1953
Druck Benno Schwabe & Co., Basel



Sonderabdruck aus
«Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta»
Vol. 11, Fasc. 1, 1953

Borsook und *Dubnoff* (1) haben gezeigt, daß Nierenschnitte der Ratte imstande sind, Citrullin in Arginin überzuführen. Die Reaktion benötigt Glutamin- oder Asparaginsäure und aerobe Bedingungen. Die Abhängigkeit vom Sauerstoff sowie die Hemmbarkeit der Reaktion durch Oxydationsgifte, wie KCN, As_2O_3 und As_2O_5 , ließen vermuten, daß die Reaktion mit einer Oxydation gekoppelt sei. Die genannten Autoren nahmen deshalb als Reaktionsmechanismus eine sogenannte «Transiminierung» an. Dabei sollte sich das Citrullin mit der Aminodicarbonsäure zu einem Kondensationsprodukt verbinden, welches oxydiert und zu Arginin und einer α -Ketosäure aufgespalten würde. Es ist aber nie gelungen, die entstehende Ketosäure zu fassen.

Der gleiche Reaktionsmechanismus wurde auch für die Harnstoffbildung aus Citrullin in der Leber angenommen (2). *Ratner* (3) hat nun in der Leber ein Fermentsystem isoliert, das imstande ist, unter anaeroben Bedingungen Citrullin und Asparaginsäure zu Arginin und Äpfelsäure umzusetzen. Dabei findet keine Oxydation, sondern nur eine Übertragung der Aminogruppe der Asparaginsäure auf das Citrullin statt.

Die Argininbildung kann in der Leber nicht direkt verfolgt werden, denn dieselbe besitzt eine sehr aktive Arginase, die das entstehende Arginin sofort zu Harnstoff und Ornithin spaltet. Es ist bisher nicht gelungen, die Arginase von den für die Argininsynthese verantwortlichen Fermenten zu trennen. Die Reaktion kann also nur indirekt durch Bestimmung des gebildeten Harnstoffs beobachtet werden.

Die Niere bietet dagegen den Vorteil, daß in diesem Organ die Arginasewirkung kaum in Betracht fällt. Nach *Kochakian* (4) soll in der Niere überhaupt keine echte Arginase vorhanden sein. Das geringe Verschwinden von Arginin soll durch Bildung von Glycocyamin erklärt werden. Jedenfalls kann die Reaktion direkt durch Bestimmung des Arginins untersucht werden. Sollte es sich erweisen, daß in der Niere das gleiche Fermentsystem wirksam ist wie in der Leber, so wäre damit die Möglichkeit gegeben, diesen wichtigen

Schritt im Zyklus der Harnstoffsynthese direkt zu beobachten. Die vorliegenden Untersuchungen wurden deshalb mit dem Zweck durchgeführt, abzuklären, ob das Fermentsystem in der Niere mit demjenigen in der Leber identisch ist.

Experimenteller Teil

Fermente

a) *Mitochondrien*: Die Herstellung der Mitochondriensuspension aus Rattenleber wurde von *Leuthardt* und *Müller* beschrieben (5). Im allgemeinen verwendeten wir zweimal mit isotonischer Mannitlösung gewaschene Mitochondrien. Die Mitochondrien aus Niere wurden in gleicher Weise hergestellt.

b) *Überstehendes*: Nach dem ersten Zentrifugieren des Homogenats wurde die überstehende, trübe Suspension abgegossen und in der Kälte während einer Stunde bei 22 000 g zentrifugiert. Die überstehende Lösung stellt dann eine klare, leicht rötlich gefärbte Flüssigkeit dar. Während dieses Überstehende der Leber direkt verwendet wurde, wurde dasjenige der Niere, um den vorgebildeten Harnstoff möglichst zu entfernen, noch während 3 Stunden gegen isotonische KCl-Lösung von 0° C dialysiert.

c) *Acetontrockenpulver der Leber*: Wir hielten uns im wesentlichen an die Angaben von *Ratner* und *Pappas* (6). Rindsleber wurde auf dem Schlachthof in Eis gekühlt. Portionen von 50 g wurden mit 300 ml vorher auf -5° C abgekühltem Aceton während 30 Sekunden im «Turmix» zerkleinert und die Flüssigkeit mit einer Nutsche abgesaugt. Der Rückstand wurde einmal mit 300 ml Aceton gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Das Trockenpulver wurde in einem Vakuumexsiccator bei 2° C aufbewahrt.

Fraktionierung: Nach den Angaben von *Ratner* und *Petrack* (7) wurden 50 g Acetontrockenpulver mit 10 Volumen 0,02 m KH_2PO_4 -Puffer pH 7,4 während 45 Minuten unter ständigem Umrühren bei 0° C extrahiert. In der gekühlten Sharpleszentrifuge wurde bei 40 000 Touren pro Minute während 10 Minuten zentrifugiert und das klare Überstehende auf 450 ml aufgefüllt. Die Fraktionierung erfolgte bei 0° C durch Zugabe von 95, 31,5 und 31,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, entsprechend 30, 40 und 50% Sättigung. Das Salz wurde jeweils während einer halben Stunde unter ständigem Rühren zugesetzt. Nach zweistündigem Rühren wurde wie oben zentrifugiert. Der Rückstand wurde jedesmal in 34 ml 0,04 m Phosphatpuffer pH 7,4 aufgenommen und in Portionen von 2 ml bei -18° C aufbewahrt. Die Fraktion von 40–50% Sättigung entspricht dem «condensing enzyme», diejenige von 20–30% dem «hydrolysing enzyme» von *Ratner*.

Milieu: Alle Ansätze enthielten auf ein Volumen von 3 ml 1 ml einer Mischung von 5 Teilen 0,04 m KH_2PO_4 -Puffer pH 7,4 und 1 Teil 0,1 m MgSO_4 -Lösung. 0,5 m KCl-Lösung wurde bis zur Isotonie zugesetzt.

Inkubation: Die Ansätze wurden in Luft während 30 Minuten im Wasserbad von 38° C geschüttelt.

Analytische Methoden

Harnstoffbestimmung: Die Reaktion wurde durch Erhitzen im siedenden Wasserbad während 4 Minuten unterbrochen. Die ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert und ein aliquoter Teil des Überstehenden manometrisch nach der Methode von *Krebs* und *Henseleit* (8) mit Arlcourese bestimmt.

Argininbestimmung: Die Enteiweißung erfolgte durch Zusatz des halben Volumens 20% Trichloressigsäure. Zur Bestimmung verwendeten wir die Methode von

Jorpes und Thorén (9). Zwischen 10 und 40 γ verläuft die Eichkurve geradlinig. Es wurde deshalb nur in diesem Bereich gemessen. Obwohl die Methode von *Dubnoff* (10) spezifischer ist, haben wir sie nicht verwendet, da wir keine regelmäßigen Eichkurven erhielten.

In der Niere haben wir das Arginin außerdem nach Inkubation mit Arginase als Harnstoff bestimmt. Als Arginasepräparat verwendeten wir ein Trockenpulver aus Leberextrakt, das wir nach den Angaben von *Hellerman und Perkins* (11) herstellten. Zu den erhitzten Ansätzen setzten wir 0,5 ml $\frac{m}{10}$ Glycocollpuffer pH 9,8 und 0,5 ml einer Suspension hinzu, die in 3 ml Glycocollpuffer 100 mg dieses Trockenpulvers enthielt. Nach 30minütiger Inkubation bei 38° C wurde die Reaktion durch Zusatz von Acetatpuffer unterbrochen und der Harnstoff manometrisch bestimmt.

Papierchromatographie: Die papierchromatographische Darstellung des Citrullins wurde von *Müller und Leuthardt* (12) beschrieben. Wir hielten uns an die dort angegebenen Vorschriften. Die Chromatographie wurde nach der absteigenden Methode mit Phenol in ammoniakalischer Atmosphäre durchgeführt. Alle Ansätze wurden vorher entsalzt. Zur Elektrodialyse verwendeten wir den Entsalzungsapparat von *Astrup* (13). Der Anodenraum wurde dabei ständig mit $\frac{m}{10}$ HCl durchströmt. Die Stromstärke fiel von anfänglich 500 m-Amp. auf einen konstanten Wert von 40–60 m-Amp. ab.

Resultate

1. Lokalisation und Spezifität des Enzyms

a) *Leber.* Komplettes Homogenat der Leber bildet aus Ornithin, Glutaminsäure, Ammonium- und Bicarbonationen bei Gegenwart von ATP und Mg-Ionen Arginin, aus welchem sofort Harnstoff entsteht (2). Dagegen bleibt die Reaktion mit reinen Mitochondrien oder ausgewaschenem Homogenat beim Citrullin stehen (14). Die Untersuchung des Überstehenden zeigt, daß das Fermentsystem, das Citrullin in Arginin überführt, in der löslichen Fraktion des Protoplasmas lokalisiert ist (Abb. 1). Außerdem geht aus der Abbildung hervor, daß das Enzym spezifisch auf Asparaginsäure eingestellt ist, indem das Überstehende in Abwesenheit von Mitochondrien nur mit Asparaginsäure, nicht aber mit Glutaminsäure reagiert. Mit Glutaminsäure findet nur dann eine Synthese statt, wenn Mitochondrien zugegeben werden. Dies ist durch das Vorhandensein einer Transaminase in den Mitochondrien zu erklären (15). Unter dem Einfluß derselben wird Glutaminsäure in Asparaginsäure übergeführt, wodurch die Bedingungen für die Argininsynthese gegeben sind.

b) *Niere.* Die Untersuchung des Überstehenden der Niere zeigt die gleiche Überlegenheit der Asparaginsäure über die Glutaminsäure, wie sie sich in der Leber feststellen läßt. Im Leberhomogenat läßt sich die Synthese mit Glutaminsäure durch Malonat hemmen (16). Diese Hemmung kann durch Fumarat wieder aufgehoben werden (17). Auch die Synthese durch das

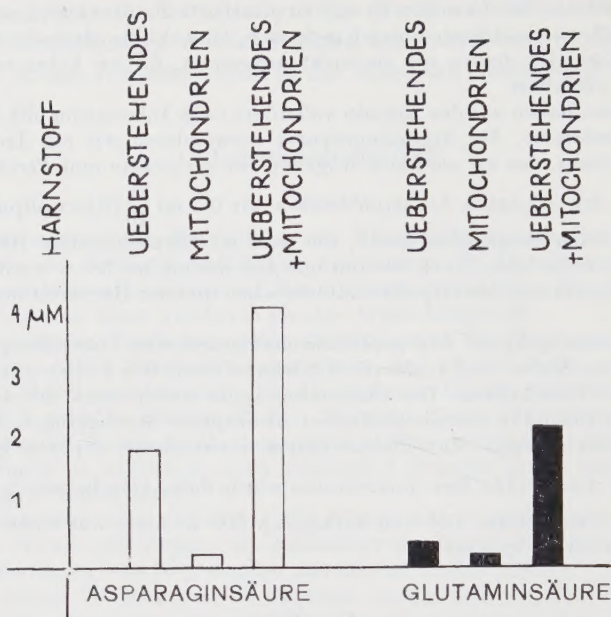


Abb. 1. Lokalisation des Fermentsystems. Alle Ansätze (Gesamtvolumen 3,0 ml) enthalten Citrullin (0,006 m), ATP (0,001 m), K_2HPO_4 -Puffer pH 7,4 (0,01 m), $MgSO_4$ (0,005 m), KCl (0,08 m). Mitochondrien und Überstehendes der Leber, wenn angegeben, je 0,3 ml. Weiße Säulen: Asparaginsäure (0,006 m) und Succinat (0,003 m); schwarze Säulen: Glutaminsäure (0,006 m). Inkubation 30 Minuten bei 38° C. Gasatmosphäre Luft. Säulen: Harnstoff in μM .

Nierenferment, die bei Zusatz von Mitochondrien mit Glutaminsäure stattfindet, läßt sich durch Malonat fast vollständig hemmen und mit Fumarat wieder aktivieren. Dagegen tritt in den Ansätzen mit Aspartat nur eine geringe Malonathemmung auf. Ohne Zusatz von Mitochondrien wird mit Glutaminsäure fast kein Arginin gebildet. Die Synthese von Arginin geht ohne Mitochondrien nur mit Aspartat vor sich, wobei Malonat keine hemmende Wirkung ausübt (Abb. 2).

Malonat hemmt also immer da, wo Glutaminsäure zuerst in Asparaginsäure übergeführt werden muß. Die Malonatwirkung beruht auf einer Hemmung der Succinodehydrase (18). Dadurch wird die Überführung der α -Ketoglutarinsäure in Oxalessigsäure auf der Stufe des Succinats blockiert und damit die Bildung der Asparaginsäure gehemmt. Trotzdem die Verminderung der ATP-Resynthese bei der Hemmung mit Malonat sicher auch eine Rolle spielt, muß doch angenommen werden, daß ihre Bedeutung in erster Linie darin liegt, daß Malonat die Überführung der Glutaminsäure in Asparaginsäure blockiert (15).

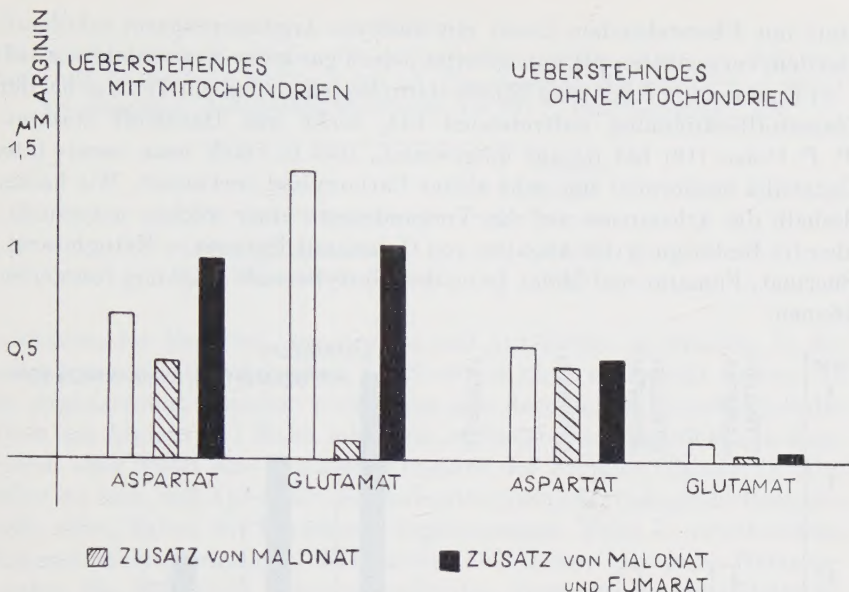


Abb. 2. Malonathemmung mit dem Nierenferment. Alle Ansätze (Gesamtvolumen 3,0 ml) enthalten Citrullin (0,006 m), Glutamin- bzw. Asparaginsäure (0,006 m), ATP (0,001 m), KH_2PO_4 -Puffer pH 7,4 (0,01 m), MgSO_4 (0,005 m), KCl (0,08 m). Überstehendes aus Niere 0,5 ml. Mitochondriensuspension aus Niere, wenn angegeben, 0,3 ml. Malonat und Fumarat (0,03 m). Inkubation 30 Minuten bei 38° C. Gasatmosphäre Luft. Säulen: Arginin in μM .

2. Zwischenprodukt

Wir haben in den Ansätzen, welche als Fermentpräparat das Überstehende der Niere enthalten, das Arginin nach zwei Methoden bestimmt: 1. direkt mit der Sakaguchi-Reaktion, 2. als Harnstoff nach Spaltung mit einem Arginasepräparat aus Leber. Es zeigte sich, daß die nach den beiden Methoden gewonnenen Werte nicht äquivalent sind. Die Harnstoffwerte sind etwa dreimal größer als die Argininwerte.

Zur Erklärung dieser Befunde sind folgende Möglichkeiten in Erwägung zu ziehen.

a) Es wäre denkbar, daß durch Arginasewirkung während der Inkubation bereits ein Teil des Arginins gespalten wird. Wir haben aber in Kontrollversuchen, bei denen bekannte Argininmengen mit dem Ferment inkubiert wurden, durchwegs Werte gefunden, die sogar etwas höher liegen als die zugehörigen Harnstoffwerte (Abb. 3) (unvollständige Spaltung des Arginins).

b) Es wäre auch möglich, daß bei der Inkubation mit Arginase, die aus Leber hergestellt ist, eine zusätzliche Bildung von Arginin aus den im Überschuß vorhandenen Substraten stattfindet. Wir haben deshalb Ansätze an-

statt mit Überstehendem direkt mit unserem Arginasepräparat inkubiert. Bei dem verwendeten pH von 9,8 tritt jedoch gar keine Argininbildung auf.

c) Eine weitere Erklärung könnte darin bestehen, daß ein Teil des bei der Harnstoffbestimmung auftretenden CO_2 nicht aus Harnstoff stammt. *P. P. Cohen* (19) hat darauf hingewiesen, daß in «jack bean meal» (aus *Canavalia ensiformis*) eine sehr aktive Carboxylase vorkommt. Wir haben deshalb die Arlcourese auf das Vorhandensein einer solchen untersucht, aber (in Bestätigung der Angaben von *Cohen*) mit Pyruvat, α -Ketoglutarat, Succinat, Fumarat und Malat keine decarboxylierende Wirkung feststellen können.

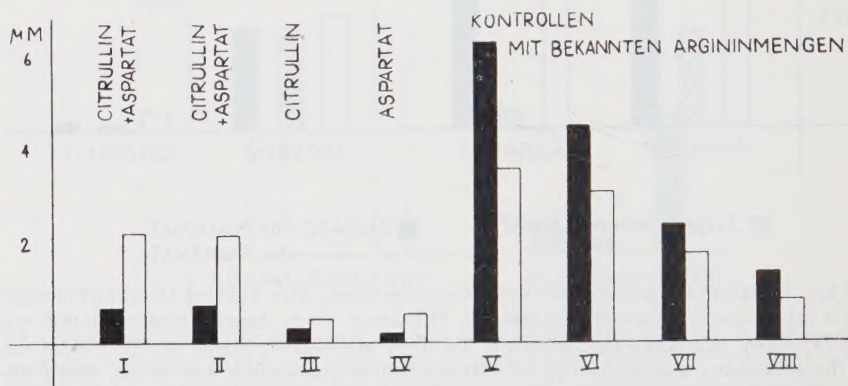


Abb. 3. Vergleich von Arginin- und Harnstoffwerten. Alle Ansätze (Gesamtvolumen 3,0 ml) enthalten ATP (0,001 m), KH_2PO_4 -Puffer pH 7,4 (0,01 m), MgSO_4 (0,005 m), KCl (0,08 m). Überstehendes der Niere 0,5 cm^3 . I und II sind identische Ansätze mit Citrullin (0,006) und Aspartat (0,006). III enthält nur Citrullin, IV nur Aspartat. V–VIII sind Kontrollen, die mit bekannten Argininkonzentrationen inkubiert wurden. Inkubation 30 Minuten bei 38°C. Gasatmosphäre Luft. Schwarze Säulen: Arginin; weiße Säulen: Harnstoff.

Nach Ausschluß all dieser Möglichkeiten bleibt nur noch die Annahme übrig, daß bei der ersten Inkubation mit dem Überstehenden der Niere ein Zwischenprodukt gebildet wird, das bei der zweiten Inkubation mit dem Arginasepräparat zu Arginin und weiter zu Harnstoff gespalten wird.

3. Umkehrbarkeit der Reaktion

Auf Grund unserer Versuche muß angenommen werden, daß vor der Behandlung mit Arginase nur der kleinere Teil des Zwischenproduktes gespalten wird. Entweder liegt also das Gleichgewicht zwischen dem Zwischenprodukt einerseits und dem Arginin und der Äpfelsäure andererseits mehr auf der Seite des Zwischenproduktes, oder die Spaltung des Zwischenproduktes durch das «hydrolysing enzyme» erfolgt so langsam, daß es sich anhäufen kann. Wir haben deshalb versucht, das Zwischenprodukt auch aus den End-

Tabelle 1

Alle Ansätze (Gesamtvolumen 3,0 ml) enthalten Arginin (0,006 m), KH_2PO_4 -Puffer pH 7,4 (0,01 m), MgSO_4 (0,005 m). Überstehendes der Niere 0,5 ml. Malat wie angegeben. Inkubation 30 Minuten bei 38° C. Gasatmosphäre Luft.

	Arginin in μM
Ohne Malatzusatz	14,65
Mit Malatzusatz (0,04 m) .	12,20

produkten der Reaktion, aus Arginin und Äpfelsäure, zu erhalten. In der Leber kann die Umkehrbarkeit der Reaktion nicht untersucht werden, da das Arginin sofort gespalten wird. Wenn man dagegen das Überstehende der Niere mit Arginin und Malat inkubiert, so findet man gegenüber den Kontrollen ohne Malat eine deutliche Abnahme des Arginins (Tabelle 1). (Um sicher zu sein, daß Äpfelsäure die Farbentwicklung der Sakaguchi-Reaktion nicht stört, haben wir bekannten Argininmengen Malat in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Wir haben dabei immer identische Werte gefunden. Zur Sicherheit haben wir aber den Ansätzen, die ohne Malat inkubiert wurden, nachträglich noch die gleiche Menge Malat zugesetzt.)

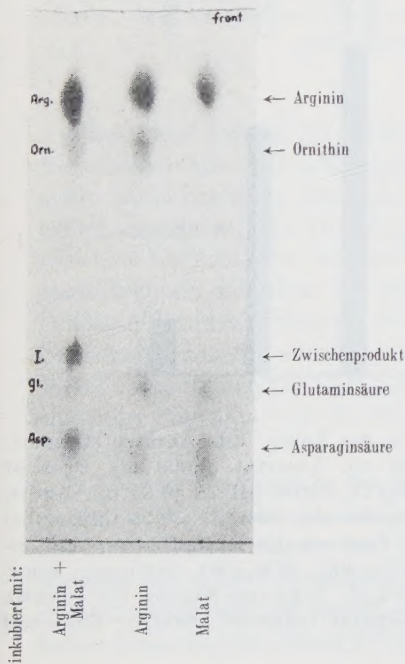


Abb. 4. Zwischenprodukt aus dem Überstehenden der Niere. Alle Ansätze (Gesamtvolumen 6,0 ml) enthielten 1,0 ml Überstehendes aus Niere, KH_2PO_4 -Puffer pH 7,4 (0,01 m), MgSO_4 (0,005 m). Der Ansatz links wurde mit 60 μM Arginin und 40 μM Äpfelsäure inkubiert, der mittlere Ansatz nur mit 60 μM Arginin, der rechte nur mit 40 μM Äpfelsäure. Inkubation 30 Minuten bei 38° C. Gasatmosphäre Luft. Um für die Papierchromatographie gleiche Bedingungen zu haben, wurde nach der Inkubation das fehlende Substrat noch zugesetzt. Chromatogramm 16 Stunden in Phenol- NH_3 -haltiger Atmosphäre.

Wir haben nun diese Ansätze chromatographisch analysiert. Bei Inkubation von Arginin und Malat mit dem Überstehenden der Niere tritt ein neuer Fleck mit einem R_f -Wert von 0,34 auf, der in den mit Arginin bzw. Äpfelsäure allein inkubierten Kontrollen nicht vorhanden ist (Abb. 4).

4. Argininsynthese in der Leber

Ratner und *Petrack* (7) nehmen an, daß die Bildung des Arginins in der Leber über ein Zwischenprodukt geht, welches durch Kondensation von Citrullin und Asparaginsäure gebildet wird. Es ist uns gelungen, dasselbe durch Papierchromatographie nachzuweisen und zu zeigen, daß die Substanz, die im Überstehenden der Niere aus Arginin und Malat entsteht, mit dem *Ratnerschen* Zwischenprodukt sehr wahrscheinlich identisch ist. Zu diesem Zweck haben wir die Versuche *Ratners*, die zur Annahme einer zweistufigen Reaktion führten, wiederholt.

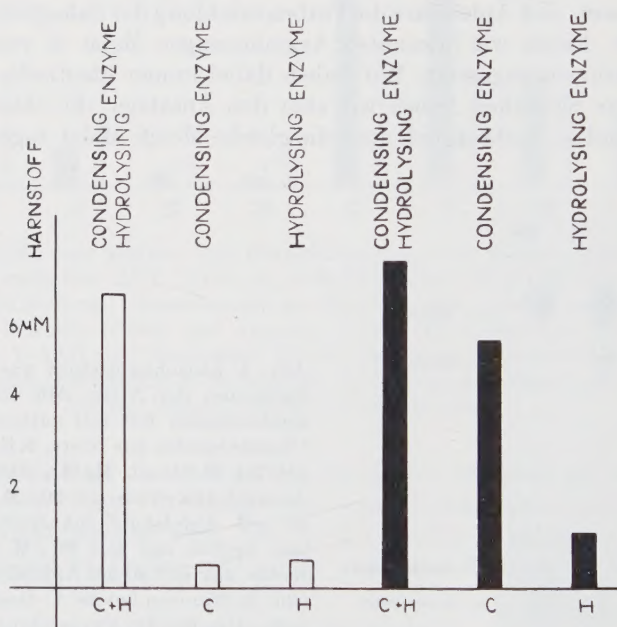


Abb. 5. Zweistufigkeit der Argininbildung in der Leber. Alle Ansätze (Gesamt-
volumen 3,0 ml) enthalten Citrullin (0,006 m), Aspartat (0,006 m), Pyruvat
(0,01 m), KCl (0,08 m), ATP (0,001 m), KH_2PO_4 -Puffer pH 7,4 (0,01 m), MgSO_4
(0,005 m), 0,3 ml einer Mitochondriensuspension aus Niere. C: 0,25 ml der bei
40–50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung ausgefallenen Fraktion des Extraktes aus Aceton-
trockenpulver; H: 0,25 ml der Fraktion von 20–30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung. Inku-
bation 30 Minuten bei 38° C. Gasatmosphäre Luft. Schwarze Säulen: Die Ansätze
wurden nachher noch mit dem Arginasepräparat inkubiert. Säulen: Harnstoff
in μM .

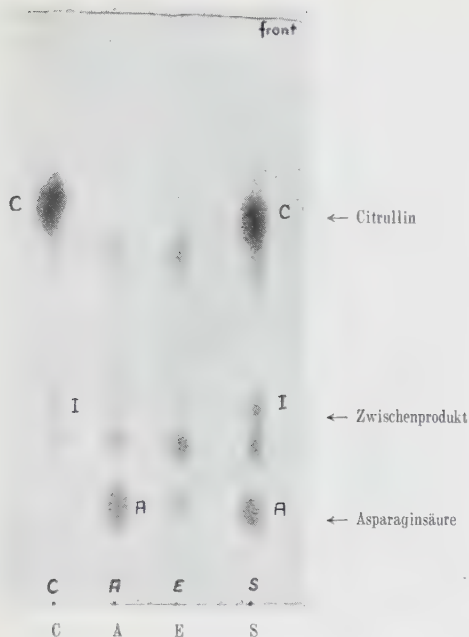


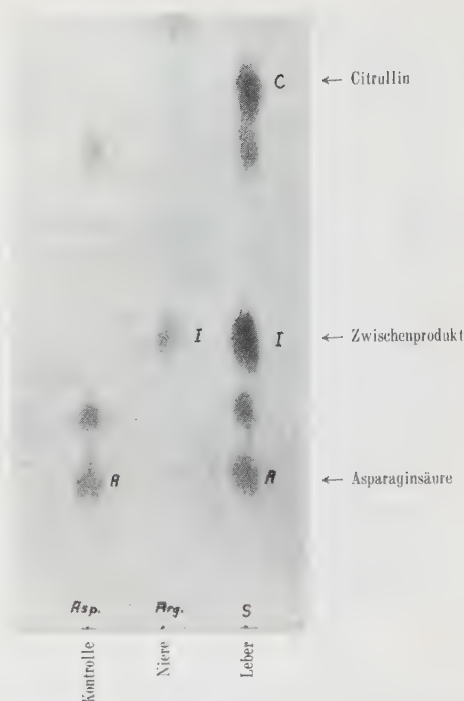
Abb. 6. Zwischenprodukt aus dem Überstehenden der Leber. Alle Ansätze (Gesamtvolumen 6,0 ml) enthalten 0,5 ml der Fraktion, die bei 40–50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung aus dem Extrakt des Acetontrockenpulvers erhalten wurde, KH_2PO_4 -Puffer pH 7,4 (0,01 m), MgSO_4 (0,005 m), ATP (0,001 m), KCl (0,08 m), Pyruvat (0,006 m) und 0,3 ml Mitochondrien-suspension aus Rattenleber. Als Substrat wurden dem Ansatz S Citrullin (0,006 m) und Aspartat (0,006 m) zugegeben. A ist eine Kontrolle mit Asparaginsäure allein, C mit Citrullin allein. E enthielt gar keine Substrate. Inkubation 30 Minuten bei 38° C. Chromatogramm 14 Stunden in Phenol- NH_3 -haltiger Atmosphäre. Im Ansatz S ist das Zwischenprodukt gut erkennbar. Auch bei der mit Citrullin allein inkubierten Kontrolle C ist das Zwischenprodukt aufgetreten, hingegen ist

die gesamte, schon im Ferment vorhandene Asparaginsäure verschwunden. Es scheint, daß dieselbe bei Gegenwart eines Überschusses an Citrullin in das Zwischenprodukt übergegangen ist.

Ratner und *Petrack* (7) haben aus Extrakt von Acetontrockenpulver der Rattenleber mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zwei Fraktionen trennen können, die für sich allein nicht imstande sind, aus Citrullin Harnstoff zu bilden. Werden sie jedoch zusammen oder in richtiger Reihenfolge nacheinander inkubiert, so tritt eine beträchtliche Harnstoffbildung auf. Da in beiden Fraktionen genügend Arginase enthalten ist, haben die Autoren geschlossen, daß unter der Wirkung des ersten Enzyms ein Zwischenprodukt gebildet wird, das durch das zweite Enzym wieder gespalten wird. Die Eiweißfraktion, die bei 40–50% Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausfällt, wurde deshalb als «condensing enzyme», diejenige von 20–30% Sättigung als «hydrolysing enzyme» bezeichnet.

Wir haben die Versuche wiederholt, wobei wir die Bedingungen etwas änderten. Die Reaktion benötigt ATP, hingegen hemmt dasselbe in höheren Konzentrationen. *Ratner* und Mitarb. haben deshalb außer katalytischen Mengen von ATP 3-Phosphoglycerinsäure und eine Fraktion aus Kaninchenmuskelextrakt als Quelle für energiereiches Phosphat zugegeben. Wir haben dieses System durch Pyruvat und Mitochondrien in einer O_2 -haltigen

Abb. 7. Vergleich der Zwischenprodukte aus Leber und Niere. Zum Vergleich der beiden Zwischenprodukte aus Leber und Niere wurden Ansätze mit dem Zwischenprodukt aus Leber (Ansatz S in Abb. 6) und solche mit dem Zwischenprodukt aus Niere (Ansatz links in Abb. 4) gleichzeitig chromatographiert. Die R_f -Werte der beiden Zwischenprodukte sind identisch. Der Ansatz links ist die in Abb. 6 mit A bezeichnete Kontrolle mit Asparaginsäure ohne Citrullin.



Atmosphäre ersetzt. Die Mitochondrien können die bei der Pyruvatoxydation freiwerdende Energie in ATP umsetzen.

Wie aus Abb. 5 ersichtlich ist, konnten wir die von *Ratner* gefundenen Resultate bestätigen. Aus der Abbildung geht außerdem hervor, daß in unserem Arginasepräparat das «hydrolysing enzyme» vorhanden sein muß, denn der mit dem «condensing enzyme» inkubierte Ansatz (C) zeigt nach Einwirkung des Arginasepräparates einen um das Vielfache höheren Harnstoffwert.

Das Arginasepräparat ist also imstande, das durch das «condensing enzyme» gebildete Zwischenprodukt zu spalten. Auch das in der Niere gebildete Zwischenprodukt wird bei der Inkubation mit dem gleichen Arginasepräparat gespalten (Abb. 3). Die Vermutung liegt daher nahe, daß es sich in der Niere und in der Leber um das gleiche Zwischenprodukt handelt. Wir haben deshalb auch die Ansätze, die nach *Ratner* mit dem «condensing enzyme» inkubiert wurden, chromatographisch untersucht. Dabei haben wir das Auftreten eines Flecks mit dem gleichen R_f -Wert feststellen können, den das Zwischenprodukt aus der Niere aufweist (Abb. 6 und 7).

Um den Beweis zu erbringen, daß es sich dabei tatsächlich um das *Ratner*-sche Zwischenprodukt handelt, haben wir die mit dem «condensing enzyme» entstandene Substanz isoliert und mit dem «hydrolysing enzyme» inku-

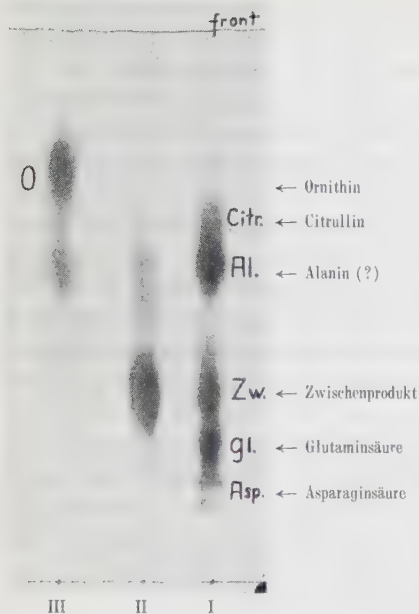


Abb. 8. Identifizierung des Zwischenproduktes. Ansätze, die das Zwischenprodukt enthalten, wurden streifenförmig auf die Grundlinie eines Chromatogramms aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 24 Stunden wurden nur die Randpartien entwickelt und aus der Mitte diejenige Region herausgeschnitten, in der sich das Zwischenprodukt befand. Diese Ausschnitte wurden während 30 Minuten in Petroläther gelegt, um das Phenol zu entfernen, und nachher mit Wasser extrahiert. Die Lösung wurde auf ein kleines Volumen eingedampft und mit der Fraktion des Acetontrockenpulvers inkubiert, die bei 20–30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung erhalten wurde («hydrolysing enzyme»). Bei I wurde die ursprüngliche Lösung aufgetragen, bei II das isolierte Zwischenprodukt, bei III die gleiche Lösung nach Inkubation mit dem «hydrolysing enzyme». Das Zwischenprodukt ist verschwunden, dafür ist Ornithin aufgetreten. Bei der Isolierung wurde auch ein

Teil des Alanins miterfaßt, das in II und III wieder erscheint. Chromatogramm 12 Stunden in Phenol- NH_3 -haltiger Atmosphäre.

biert. Das «hydrolysing enzyme» sollte das Zwischenprodukt in Arginin und Äpfelsäure spalten, wobei durch die auch dort vorhandene Arginase aus dem Arginin sofort Ornithin und Harnstoff entstehen würde. Abb. 8 zeigt, daß nach Inkubation mit der Fraktion, die bei 20–30% Sättigung mit Ammoniumsulfat aus dem Extrakt des Acetontrockenpulvers erhalten wird und die dem «hydrolysing enzyme» entspricht, das Zwischenprodukt verschwindet und Ornithin entsteht.

Die Substanz, die bei Inkubation von Arginin und Malat mit dem Nierenferment entsteht, haben wir auf gleiche Weise isoliert und mit dem «hydrolysing enzyme» inkubiert. Auch dabei konnten wir das Auftreten von Ornithin feststellen. Die beiden Produkte zeigen also identische R_f -Werte und werden durch das gleiche Fermentpräparat zu Arginin bzw. Ornithin gespalten.

Diskussion

Ratner hat für die Leber nachgewiesen, daß die Reaktion Citrullin → Arginin nicht oxydativer Natur ist (20). Die Reaktion geht in der Niere unter gleichen Bedingungen vor sich wie in der Leber. Auch die Beobachtung, daß sich die Reaktion aus den Endprodukten Arginin und Äpfelsäure in umgekehrter Richtung durchführen läßt, spricht dafür, daß in der Niere der

gleiche Mechanismus tätig ist wie in der Leber. Ebenso weisen die gleiche Substratspezifität und das Auftreten eines Zwischenproduktes mit dem gleichen R_f -Wert auf eine Identität der beiden Fermentsysteme hin.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Niere und Leber besteht darin, daß sich in der Fermentlösung aus Niere das Zwischenprodukt anreichert, in der Fermentlösung aus Leber dagegen nicht. Dies beruht sehr wahrscheinlich auf dem Fehlen der Arginase in der Niere. Das Arginin wird hier nicht entfernt; dabei kann sich ein Gleichgewichtszustand zwischen der Intermediärstufe und ihren Zerfallsprodukten einstellen.

Worauf die von *Borsook* und *Dubnoff* (21) beobachtete Tatsache beruht, daß die Harnstoffbildung aus Citrullin im Leberhomogenat durch 0,0026 m Na-Arsenat nicht beeinflusst wird, während dieselbe Arsenkonzentration in Nierenschnitten die Reaktion vollständig unterdrückt, können wir nicht entscheiden.

Für die Harnstoffbildung ist die Frage grundlegend, wie das Ammoniak, das bei der Desaminierung der Aminosäuren frei wird (22), in Asparaginsäure übergeht. Die wichtige Rolle, die die Glutaminsäure bei der Aufnahme des NH_3 in den Stoffwechsel spielt, wurde vor allem durch die Arbeiten von *von Euler* (23) und die Isotopenuntersuchungen mit N^{15} (24) bekannt. Es ist bisher kein Ferment gefunden worden, welches in ähnlicher Weise die Oxallessigsäure unter Aufnahme von NH_3 reduktiv in Asparaginsäure umwandelt (25). Wir müssen deshalb annehmen, daß das Ammoniak zuerst von der α -Ketoglutarinsäure unter Bildung von Glutaminsäure aufgenommen wird. Von der Glutaminsäure kann das NH_3 leicht durch die von *Braunstein* und *Kritzmann* entdeckte Transaminierung auf Oxallessigsäure übergehen (26). Daß diese Glutaminsäure-Oxallessigsäure-Transaminase auch in den Mitochondrien vorhanden ist, konnte von *Müller* und *Leuthardt* gezeigt werden (15).

Schwierig zu lösen ist die Frage nach der Bedeutung dieses Ferment-systems in der Niere. Denn die Niere ist weder imstande, aus Ornithin Citrullin zu bilden noch Arginin zu spalten. *Borsook* und *Dubnoff* (1) vermuteten, daß dem Enzym eine Bedeutung für die Glycocyaminbildung zukommen könnte. Bei der Glycocyaminbildung wird die Amidgruppe des Arginins auf die Aminogruppe des Glykokolls übertragen. Das Ferment würde dabei das Arginin zur Verfügung stellen. Citrullin entsteht, soweit bisher bekannt ist, nur in der Leber. Man müßte also annehmen, daß ein Teil ins Blut übergeht und in der Niere zu Arginin verwandelt werden kann. Dies wäre durchaus möglich, weil unter den Reaktionen des Ornithinzyklus der Übergang des Citrullins in das Arginin die langsamste ist. Die Bedeutung des Ferments für die Niere ist aber noch keineswegs geklärt.

Zusammenfassung

1. Wir haben die Argininbildung aus Citrullin in der Niere untersucht und mit der gleichen Reaktion in der Leber verglichen. Das Fermentsystem ist

in beiden Organen in der löslichen Fraktion des Protoplasmas lokalisiert und spezifisch auf Asparaginsäure als NH_2 -Donator eingestellt.

2. Bei der Inkubation von Citrullin und Asparaginsäure mit dem Nierenferment wird ein Zwischenprodukt angereichert, aus welchem durch eine Proteinfraction aus Leber, welche das «hydrolysing enzyme» von *Ratner* und Arginase enthält, Harnstoff gebildet wird.

3. Wir haben das Zwischenprodukt der Ratnerschen Reaktion, welches durch das «condensing enzyme» aus Citrullin und Asparaginsäure gebildet wird, durch Papierchromatographie direkt nachweisen können.

4. Bei Inkubation von Arginin und Malat mit dem Nierenferment verschwindet Arginin, wobei ein Stoff gebildet wird, der chromatographisch identisch ist mit dem Zwischenprodukt der Ratnerschen Reaktion.

5. Aus den vorstehenden Beobachtungen kann geschlossen werden, daß die zweite, durch das «hydrolysing enzyme» katalysierte Stufe der Ratnerschen Reaktion umkehrbar ist und daß die Synthese des Arginins in der Niere und in der Leber durch das gleiche Fermentsystem bewerkstelligt wird.

Summary

1. The synthesis of arginine from citrulline and aspartic or glutamic acid in liver and kidney has been compared. In both organs the enzyme system is localized in the "soluble" fractions of the cells. In kidney or in liver the enzyme is specific for aspartic acid.

2. Incubation of citrulline and aspartate with the kidney enzyme furnishes an intermediary product which is transformed into urea by a protein fraction from liver containing the "hydrolysing enzyme" of *Ratner* and arginase.

3. The intermediary product of the reaction of *Ratner* has been identified by paper chromatography.

4. Incubation of arginine and malate with kidney enzyme leads to the disappearance of arginine and to the formation of a product with the same R_f value as the intermediary product of *Ratner*.

5. From these facts we may conclude that the splitting of the intermediary product is a reversible reaction and that the synthesis of arginine from citrulline and aspartate is catalysed by the same enzyme system in kidney and in liver.

1. *Borsook H. and Dubnoff J. W.*: The conversion of citrulline to arginine in kidney. *J. biol. Chem. (Am.)* **141**, 717-738 (1941).

2. *Cohen P. P. and Hayano M.*: a) The conversion of citrulline to arginine (transamination) by tissue slices and homogenates. *J. biol. Chem. (Am.)* **166**, 239-250 (1946).

b) Urea synthesis by liver homogenates. *J. biol. Chem. (Am.)* **166**, 251-259 (1946).

3. *Ratner S.*: The enzymatic mechanism of arginine formation from citrulline. *J. biol. Chem. (Am.)* **170**, 761-762 (1947).

4. Zit. bei *Greenberg D. M.*: Arginase, in *Sumner J. B.* and *Myrbäck K.*: The enzymes, Vol. **1**, S. 899, Academic Press Inc., New York 1951.
5. *Leuthardt F.* und *Müller A. F.*: Mitochondrien und Citrullinsynthese in der Leber. *Experientia* **4**, 478–480 (1948).
6. *Ratner S.* and *Pappas A.*: Biosynthesis of urea. I. Enzymatic mechanism of arginine synthesis from citrulline. *J. biol. Chem. (Am.)* **179**, 1183–1198 (1949).
7. *Ratner S.* and *Petrack B.*: Biosynthesis of urea. III. Further studies on arginine synthesis from citrulline. *J. biol. Chem. (Am.)* **191**, 693–705 (1951).
8. *Krebs H. A.* und *Henseleit K.*: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Z. physiol. Chem.* **210**, 33–66 (1932).
9. *Jorpes E.* und *Thorén S.*: The use of the Sakaguchi reaction for the quantitative determination of arginine. *Biochem. J. (Brit.)* **26**, 1504–1506 (1932).
10. *Dubnoff J. W.*: A micromethod for the determination of arginine. *J. biol. Chem. (Am.)* **141**, 711–716 (1941).
11. *Hellerman L.* and *Perkins M. E.*: Activation of enzymes. III. The rôle of metal ions in the activation of arginase. The hydrolysis of arginine induced by certain metal ions with urease. *J. biol. Chem. (Am.)* **112**, 175–194 (1935).
12. *Müller A. F.* und *Leuthardt F.*: Nachweis der Citrullinbildung in Mitochondrien-suspensionen und Gewebsschnitten aus Leber durch Papierchromatographie. *Helv. chim. Acta* **32**, 2289–2294 (1949).
13. *Astrup T. O. E.* and *Stage A.*: A desalting apparatus for paper chromatography. 18th International Congress of Physiology, Copenhagen 1950 (Abstracts of Communications, S. D 537 [1950]).
14. *Leuthardt F.*, *Müller A. F.* und *Nielsen H.*: Biologische Citrullinsynthese, Glutamin und α -Ureidoglutarsäure. *Helv. chim. Acta* **32**, 744–756 (1949).
15. *Müller A. F.* und *Leuthardt F.*: Die Umwandlung der Glutaminsäure in Asparaginsäure in den Mitochondrien der Leber. *Helv. chim. Acta* **33**, 268–273 (1950).
16. *Cohen P. P.* and *Hayano M.*: The conversion of ornithine to citrulline by rat liver homogenates. *J. biol. Chem. (Am.)* **170**, 687–699 (1947).
17. *Fahrländer H.*, *Favarger P.* und *Leuthardt F.*: Untersuchungen über die Reaktion von Borsook und Dubnoff. I. Die Hemmung der Reaktion durch Malonat. *Helv. chim. Acta* **31**, 942–957 (1948).
18. a) *Quastel J. H.* and *Woolridge W. R.*: Some properties of the dehydrogenating enzymes of bacteria. *Biochem. J. (Brit.)* **22**, 689–707 (1928).
 b) *Quastel J. H.* and *Wheatley A. H. M.*: Biological oxydations in the succinic acid series. *Biochem. J. (Brit.)* **25**, 117–128 (1931).
 c) *Mann P. J. G.* and *Quastel J. H.*: Nicotinamide, cozymase and tissue metabolism. *Biochem. J. (Brit.)* **35**, 502–517 (1941).
19. *Cohen P. P.*: The carboxylase activity of Jack Beans (*Canavalia ensiformis*) and Soy Beans (*Glycine hispida*). *J. biol. Chem. (Am.)* **164**, 685–689 (1946).
20. *Ratner S.*: Mechanism of urea synthesis. *Fed. Proc.* **8**, 603–609 (1949).
21. *Borsook H.* and *Dubnoff J. W.*: Ornithine-catalysed urea formation in liver homogenate. *J. biol. Chem. (Am.)* **169**, 461–462 (1947).
22. *Krebs H. A.*: Metabolism of amino-acids. III. Determination of amino-acids. *Biochem. J. (Brit.)* **29**, 1620–1644 (1935).
23. *von Euler H.*, *Adler E.*, *Günther G.* und *Das N. B.*: Über den enzymatischen Abbau und Aufbau der Glutaminsäure. II. In tierischen Geweben. *Z. physiol. Chem.* **254**, 61–103 (1938).
24. a) *Foster G. L.*, *Schönheimer R.* and *Rittenberg D.*: Studies in protein metabolism. V. The utilisation of ammonia for amino-acid and creatine formation in animals. *J. biol. Chem. (Am.)* **127**, 319–327 (1939).

- b) *Schönheimer R., Ratner S. and Rittenberg D.*: Studies in protein metabolism. X. The metabolic activity of body proteins investigated with 1(-)-leucine containing two isotopes. *J. biol. Chem. (Am.)* **130**, 703-732 (1939).
25. *Virtanen A. I. and Rautanen N.*: Nitrogen assimilation, in *Sumner J. B. and Myrbäck K.*: The enzymes, Vol. **2**, part 2, S. 117. Academic Press Inc., New York 1952.
26. *Braunstein A. E. und Kritzmann M. G.*: Über den Ab- und Aufbau von Aminosäuren durch Umaminierung. *Enzymologia* **2**, 129-146 (1937).

Curriculum vitae

Ich wurde am 13. Juni 1926 in Basel geboren. Ich besuchte daselbst die Primarschule und das Humanistische Gymnasium, wo ich im Frühjahr 1945 die Maturität bestand. Das erste propaedeutische Examen legte ich im Herbst 1946, das zweite im Herbst 1947 in Basel ab. Nach den klinischen Semestern in Basel und London (Guy's Hospital Medical School) bestand ich im Frühjahr 1951 in Basel das eidgenössische Staatsexamen. Im Sommersemester 1951 besuchte ich ein ganztägiges Praktikum an der organisch-chemischen Anstalt in Basel (Prof. Reichstein). Seit November 1951 arbeite ich am physiologisch-chemischen Institut der Universität Zürich unter Prof. Leuthardt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Leuthardt für seine ständige Hilfe und Anregung bei der Durchführung dieser Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen. Er war stets bereit, mir mit seiner freundlichen Unterstützung beizustehen.

